

ISOLASI DAN KARAKTERISASI KEMAMPUAN BAKTERI ENDOFIT SORGUM MANIS FS501 SEBAGAI PENDUKUNG PERTUMBUHAN TANAMAN

Charlie Ester de Fretes

Pusat Penelitian Laut Dalam, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Y. Syaranamual, Ambon, Maluku, 97123, Indonesia

*Corresponding author: charlie.defretes@gmail.com

ABSTRACT

This study aims to isolate endophytic bacteria of sweet sorghum plants and characterize their ability as plant growth promoting. The characters tested in this study were the ability of endophytic bacteria in N fixation, phosphate dissolving, and IAA production to be developed as biological fertilizer agents. Twenty-four isolates were isolated from the roots, stems and shoots of sweet sorghum. The results of bacterial DNA fingerprint screening showed that 11 groups of endophytic bacteria had different fingerprints. Isolates capable of N fixation were grown on LGI media and showed a change in the color of the medium. The *nifH* gene detection is also carried out to determine endophytic diazotrophic bacteria. Isolate bacteria that can dissolve inorganic phosphate were tested using Pikovskaya media. Testing the ability of isolates to produce IAA was carried out by adding Salkowski's reagent to the bacterial culture and measured quantitatively with a λ 530 nm spectrophotometer. The results showed that two endophytic bacterial isolates proved to be diazotrophic and three isolates were able to dissolve phosphate, while one isolate was able to produce IAA. PA2 isolate showed ability in all the characters tested, namely N fixation, phosphate solvent and IAA producer.

Keywords: Endophytic bacteria, *nifH* gene, plant growth promoting bacteria.

PENDAHULUAN

Secara global, sorgum manis adalah sereal terpenting keempat dan digunakan untuk makanan, pakan, dan produksi bioetanol (Kim & Day, 2011). Dalam peningkatan produktivitas tanaman, pemakaian pupuk kimia untuk melengkapi nutrisi dalam tanah tidak terelakkan (Kumar *et al.*, 2009). Penggunaan pupuk kimia yang terus-menerus juga dapat menyebabkan kerusakan ekologi tanah, degradasi lingkungan, menurunkan kesuburan tanah dan akibatnya memberikan efek merugikan pada kesehatan manusia (Ayala & Rao, 2002) serta mencemari air tanah (Joshi *et al.*, 2006). Masalah tersebut menekankan perlunya teknologi baru di bidang pertanian dengan tujuan mencapai sistem produksi yang lebih berkelanjutan. Sebuah alternatif untuk mengurangi penggunaan pupuk kimia adalah penggunaan bakteri (agen hayati) yang dapat memacu pertumbuhan tanaman (Lugtenberg & Kamilova, 2009).

Bakteri endofit adalah bakteri yang hidup di dalam jaringan tanaman dan tidak menyebabkan gejala penyakit terhadap inang. Interaksi saling menguntungkan antara bakteri endofit dengan tanaman antara lain bakteri mendapat nutrisi, perlindungan terhadap cekaman lingkungan, serta penyebaran secara pasif antar inang atau melalui vektor (Schulz & Boyle, 2006). Oleh karena itu, bakteri endofit lebih terlindungi dari cekaman biotik dan abiotik dibandingkan dengan bakteri rizosfer (Hallmann *et al.*, 1997). Keuntungan yang diperoleh tanaman inang yaitu resistensi terhadap mikroba

patogen menjadi terinduksi serta meningkatnya pertumbuhan dengan adanya fiksasi nitrogen, pelarut P, dan produksi fitohormon (Schulz & Boyle, 2006). Endofit bakteri dikenal karena efek menguntungkannya pada pertumbuhan dan kesehatan tanaman yang diterapkan secara luas di area pertanian berkelanjutan. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui mendapatkan isolate bakteri endofit pada tanaman sorgum manis cv. FS501 dan mengkarakterisasi kemampuannya sebagai pendukung pertumbuhan tanaman.

METODE PENELITIAN

Isolasi bakteri endofit dari sorgum manis

Keragaman bakteri endofit diperkirakan pada akar, batang dan ujung *Sorghum bicolor* cv. Kotobun Sorgo (FS501). Benih ditanam pada tanah regosol yang berasal dari daerah Piyungan (07°53'41.3" S, 110°32'53.3" E), Kabupaten Gunung Kidul, Yogyakarta, Indonesia. Sterilisasi akar, batang dan ujung tanaman sorgum manis dilakukan dengan merendam 10 g organ tanaman yang telah dicuci dengan air mengalir di dalam 70% EtOH selama 5 menit dan 4% sodium hipoklorit selama 20 menit, kemudian dibilas sebanyak empat kali dengan akuades steril. Air bilasan terakhir diinokulasikan pada medium TSA dan diinkubasi selama 5 hari untuk konfirmasi sterilisasi permukaan organ tanaman (Mareque *et al.*, 2014). Setelah inkubasi,

dilakukan pengamatan terhadap pertumbuhan bakteri. Sampel yang dapat digunakan untuk uji selanjutnya, apabila tidak terdapat pertumbuhan bakteri pada uji konfirmasi sterilisasi permukaan tanaman.

Bagian tanaman steril ditimbang sebanyak 5 g dan dihaluskan menggunakan mortar steril, kemudian dilarutkan dengan 0,85% NaCl dan dilakukan pengenceran hingga 10^{-3} . Setelah itu, sebanyak 100 μ L diinokulasikan pada medium TSA dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 5 hari. Teknik *streak* dilakukan beberapa kali untuk mendapatkan isolat murni. Semua isolat yang diperoleh dimurnikan dan disimpan pada suhu -80°C dalam 50% gliserol.

Skrining isolat bakteri endofit dengan evaluasi keragaman genom bakteri menggunakan metode repetitive-PCR

Bakteri endofit yang diisolasi dikultur dalam kaldu TS pada suhu kamar selama 48 jam dan disentrifugasi pada 14.000 g selama 5 menit. DNA genom diekstraksi dari pellet dengan menggunakan *FavorPrep™ Genomic DNA Isolation Mini Kit*. Primer yang digunakan adalah primer BOX-A1R dengan urutan nukleotida 5-TAC GGC AAG GCG ACG CTG ACG-3. Kondisi reaksi yang digunakan adalah sebagai berikut: sebanyak 12,5 μ L *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 1 μ L primer, 1 μ L DNA template, 10,5 μ L *free nuclease water* (Promega). DNA diamplifikasi dengan program sebagai berikut: predenaturasi 94°C selama 4 menit, diikuti denaturasi pada 92°C selama 1 menit, *annealing* pada 50°C selama 1 menit 30 detik, *extension* pada 68°C selama 8 menit, serta *final extension* pada 72°C selama 10 menit. Reaksi PCR dilakukan sebanyak 30 siklus. Semua produk yang telah teramplifikasi dipisahkan menggunakan gel elektroforesis dengan 2% agarose dalam 1x TBE buffer selama 30-60 menit dengan tegangan 100 V dan diwarnai dengan SYBR. Pemilihan isolat dilakukan dengan pengamatan sidik jari DNA setiap isolat.

Pengujian bakteri endofit sebagai pendukung pertumbuhan tanaman

Pengujian isolat bakteri endofit dalam menambat nitrogen dilakukan dengan menggunakan medium LGI semi padat (medium bebas N). Isolat bakteri diinokulasikan pada medium LGI dan ditumbuhkan pada suhu ruang. Setelah 5 hari inkubasi, dilakukan pengamatan terhadap perubahan warna medium dan pelikel pada permukaan medium sebagai penanda terjadinya penambatan N (Kirchhof *et al.*, 1997). Deteksi isolat diazotrofik dilakukan deteksi gen *nifH* dengan amplifikasi PCR menggunakan primer PolF (5'-TGCGAYCCSAARGCBGACTC-3') dan PolR (5'-ATSGCCATCATYTCRCCGGA-3'). Campuran PCR mengandung 12,5 μ L *GoTaq buffer* reaksi, 8,5 μ L *free nuclease water* (Promega), 1 μ L primer, dan 2 μ L DNA template, dalam volume reaksi akhir 25 μ L. Amplifikasi dilakukan dengan kondisi sebagai

berikut: pre-denaturasi 95°C selama 5 menit, denaturasi pada 95°C selama 45 detik, *annealing* pada 58°C selama 45 detik, *extension* pada 72°C selama 30 detik sebanyak 30 siklus, dan ekstensi akhir pada 72°C selama 5 menit. Produk amplifikasi divisualisasikan dengan elektroforesis gel agarosa 1,5% (b/v) dalam buffer TBE 1% dan diwarnai dengan SYBR (Invitrogen).

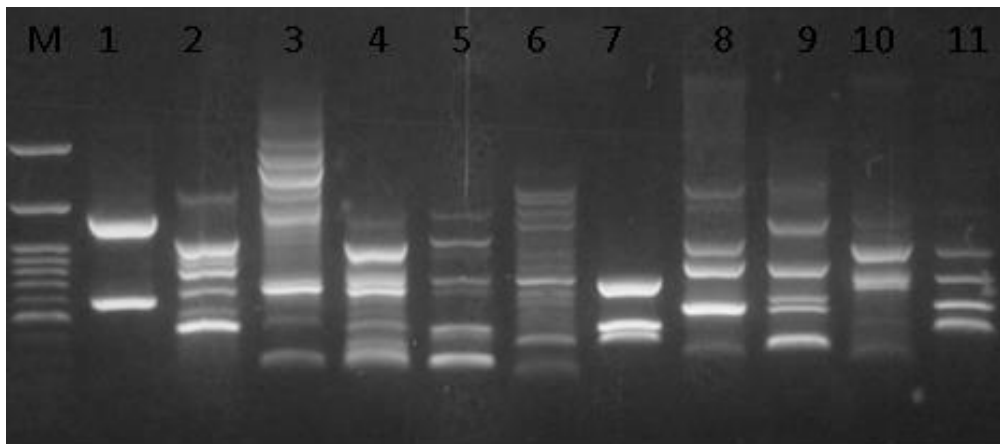
Pengujian bakteri endofit penghasil IAA dilakukan secara kuantitatif dengan metode kolorimetri. Isolat bakteri endofit diinokulasikan pada tabung reaksi yang berisi 5 mL medium TSB yang mengandung 1 mg/mL *L-tryptophan* pada pH 7,0 dan diinkubasi pada suhu ruang selama 24-48 jam dengan dishaking. Kemudian kultur di sentrifugasi pada 13.000 rpm selama 15 menit. Satu milliliter supernatan dicampur dengan 2 mL reagen Salkowski (50 mL 35% HClO₄ dan 1 mL 0,5 M FeCl₃.6H₂O) dan dibiarkan selama ± 30 menit untuk pengembangan warna, adanya produksi IAA ditandai dengan munculnya warna pink. Analisis kuantitatif IAA dilakukan dengan spektrofotometer pada λ 530 nm. Analisis kualitatif konsentrasi IAA dilakukan dengan membuat kurva standar IAA. Pengujian bakteri endofit pelarut fosfat dengan menginokulasi isolat bakteri endofit pada medium Pikovskaya (Afzal & Bano, 2008). Setelah inkubasi selama 72 jam, dilakukan pengamatan pada pertumbuhan isolat. Pada medium yang mengandung isolat endofit pelarut fosfat akan terdapat daerah *halo clear* (daerah bening) disekitar koloni.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Bakteri endofit pada sorgum manis FS501

Sebanyak 24 isolat bakteri endofit sorgum manis diambil secara selektif berdasarkan pertumbuhannya pada media TSA. Untuk membedakan isolat bakteri endofit digunakan teknik perbandingan sidik jari profil DNA bakteri. Profil DNA sidik jari ini diperoleh dengan metode *repetitive* PCR (rep-PCR) menggunakan primer BOX A1R. Isolat memiliki profil sidik jari yang sama yang diklasifikasikan ke dalam satu kelompok. Berdasarkan profil sidik jari DNA diperoleh 11 kelompok bakteri endofit yang memiliki sidik jari berbeda (5 isolat dari akar, 4 isolat dari batang, dan 2 isolat dari ujung tanaman) seperti yang tersaji pada Gambar 1.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keanekaragaman bakteri endofit di akar lebih tinggi dibandingkan batang dan pucuk. Studi sebelumnya tentang interaksi komunitas bakteri endofit/tumbuhan telah menunjukkan bahwa keragaman bakteri endofit menurun dari akar ke batang (Hallmann *et al.*, 1997). Keberadaan spesies endofit yang berbeda tergantung dari genotipe tanaman, umur tanaman, sampel jaringan, musim isolasi (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004) dan jenis tanah (Conn & Franco, 2004).



Gambar 1. Profil sidik jari bakteri endofit dari sorgum manis FS501; M-Marker 100 bp, 1- isolat PA2, 2- isolat PA3, 3- isolat PA9, 4- isolat PA16, 5- isolat PA21, 6- isolat PA24, 7- isolat PA25, 8- isolat PA31, 9- isolat PA35, 10- isolat PA38, 11- isolat PA42

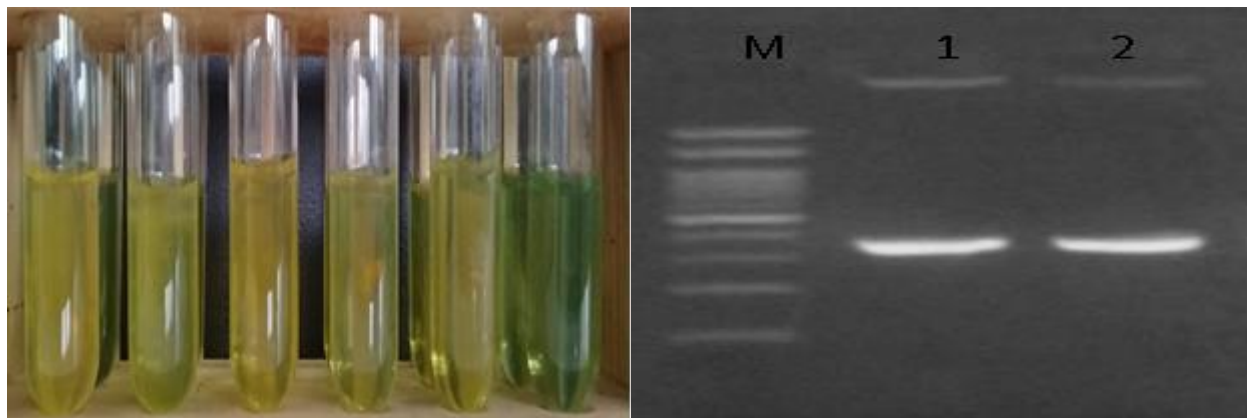
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa keanekaragaman bakteri endofit di akar lebih tinggi dibandingkan batang dan pucuk. Studi sebelumnya tentang interaksi komunitas bakteri endofit/tumbuhan telah menunjukkan bahwa keragaman bakteri endofit menurun dari akar ke batang (Hallmann *et al.*, 1997). Keberadaan spesies endofit yang berbeda tergantung dari genotipe tanaman, umur tanaman, sampel jaringan, musim isolasi (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004) dan jenis tanah (Conn & Franco, 2004).

Pengujian bakteri endofit sebagai pendukung pertumbuhan tanaman

Kemampuan fiksasi nitrogen endofit bakteri sorgum manis disaring dengan amplifikasi parsial gen *nifH*. Primer *nifH* untuk memperkuat fragmen *nifH* 360 bp dari DNA yang diisolasi dari berbagai mikroorganisme diazotrofik (Poly *et al.*, 2001). Pengujian kemampuan bakteri endofit dalam menambat nitrogen diamati dengan perubahan warna

pada medium LGI dari biru ke kuning dan deteksi gen *nifH*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 6 isolat yang mampu tumbuh pada medium LGI dan 2 isolat yang mampu menambat nitrogen (Gambar 2). Isolat bakteri yang mampu menambat nitrogen yaitu isolat PA2 dan isolat PA9.

Kemampuan bakteri diazotrof untuk melakukan penambatan nitrogen disebabkan oleh aktivitas nitrogenase. Nitrogenase merupakan enzim kompleks yang berperan dalam pengubahan bentuk nitrogen bebas di udara menjadi amonia (NH_3). Nitrogenase terdiri atas dua komponen yaitu komponen I (dinitrogenase atau protein Fe-Mo) dan komponen II (dinitrogenase reduktase atau protein Fe). Nitrogenase dikode oleh sekitar 20 gen *nif* (Lee *et al.*, 2000), diantara 20 gen *nif* tersebut, gen *nifH* merupakan gen terpenting yang dapat digunakan untuk mendeteksi keberadaan nitrogenase karena menyandi subunit pembentuk kompleks nitrogenase (Choo *et al.*, 2003).



Gambar 2. Pertumbuhan bakteri endofit pada medium LGI dan amplifikasi gen *nifH* bakteri endofit dari sorgum manis; Lane M-Marker 100 bp, 1- isolat PA2, 2- isolat PA9

Hasil penelitian menunjukkan bahwa isolat bakteri endofit PA2 mampu menghasilkan IAA

sebesar 44,083 $\mu\text{g/mL}$. Kemampuan bakteri endofit dalam menghasilkan IAA ditandai dengan perubahan

warna medium TSB dengan penambahan reagen Salkowsky. Semakin pekat warna merah yang terbentuk menandakan semakin tinggi IAA yang mampu dihasilkan oleh bakteri.

Kemampuan isolat bakteri endofit untuk melarutkan fosfat ditunjukkan dengan adanya zona bening yang terbentuk pada medium Pikovskaya. Hasil penelitian menunjukkan bahwa terdapat 3 isolat bakteri endofit yang mampu melarutkan fosfat anorganik yaitu isolat PA2, PA31, dan PA35. Isolat bakteri endofit dapat memberikan manfaat sebagai pelarut fosfat saat diinokulasikan sebagai agen hayati ke tanah. Bakteri endofit dapat memberikan kontribusi untuk menyediakan fosfat yang dapat diserap oleh tanaman.

Mekanisme pelarutan dari fosfat oleh bakteri endofit melibatkan beberapa enzim antara lain C-P lyase, fosfatase, dan phytase. Sebagian besar genus mikroba melarutkan fosfat melalui produksi asam organik seperti glukonat, ketoglukonat, asetat, laktat, oksalat, tartarat, suksinat, sitrat, dan glikolat. Jenis asam organik yang diproduksi untuk melarutkan fosfat dapat bergantung pada sumber karbon yang digunakan sebagai substrat.

Penelitian menunjukkan bahwa mekanisme pelarutan P tertinggi telah diamati saat penggunaan glukosa, sukrosa, atau galaktosa sebagai sumber karbon tunggal dalam medium (Park *et al.*, 2011).

KESIMPULAN

Kemampuan isolat endofit untuk peningkatan pertumbuhan tanaman ditunjukkan dengan kemampuan fiksasi nitrogen, pelarutan fosfat, dan produksi IAA. Isolat PA2 menunjukkan semua kemampuan yang menunjukkan perannya dalam meningkatkan pertumbuhan sorgum manis. Potensinya menjadi penting untuk mempelajari lebih lanjut mengenai pemanfaatan inokulan mikroba pemacu pertumbuhan untuk meningkatkan pertumbuhan tanaman sorgum manis. Strain khusus ini akan menjadi kepentingan komersial bagi perusahaan bioteknologi dengan tujuan memproduksi inokulan untuk kultivar sorgum manis.

DAFTAR PUSTAKA

Afsal, A., Bano, A. (2008). Rhizobium and phosphate solubilizing bacteria improve the yield and phosphorus uptake in wheat (*Triticum aestivum*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 10: 85-88.

Ayala, S., Rao, E.V.S.P. (2002). Perspective of soil fertility management with a focus on fertilizer use for crop productivity. *Current Science*, 82: 797-807.

Choo, Q.C., Samian, M.R., Najimudin, N. (2003). Phylogeny and characterization of three nifH-homologous genes from *Paenibacillus azotofixans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3658-3662.

Conn, V. M., Franco, C. M. M. (2004). Analysis of the endophytic actinobacterial population in the roots of wheat (*Triticum aestivum* L.) by terminal restriction fragment length polymorphism and sequencing of 16S rRNA clones. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:1787-1794.

Hallmann J, A. Quadts-Hallmann, W.F. Mahaffee, J. Kloepper. (1997). Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology*, 43:895-914.

Joshi, K.K., Kumar, V., Dubey, R.C., Maheshwari, D.K. (2006). Effect of chemical fertilizer adaptive variants, *Pseudomonas aeruginosa* GC2 and *Azotobacter chroococcum* AC1 on *Macrophomina phaseolina* causing charcoal rot of *Brassica juncea*. *Korean Journal of Environmental Agriculture*, 25: 228-235.

Khan, Z., S.L. Doty. (2009). Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant and Soil*, 322: 197-207.

Kim, M., Day, D.F. (2011). Composition of sugar cane, energy cane, and sweet sorghum suitable for ethanol production at Louisiana sugar mills. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38:803-807.

Kuklinsky-Sobral, J., Araujo, W. L., Mendes, R., Geraldi, I. O., Pizzirani-Kleiner, A. A., Azevedo, J. L. (2004). Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology*, 6:1244-1251.

Kumar, S., Pandey, P., Maheshwari, D.K. (2009). Reduction in dose of chemical fertilizers and growth enhancement of sesame (*Sesamum indicum* L.) with application of rhizospheric competent *Pseudomonas aeruginosa* LES4. *European Journal of Soil Biology*, 45: 334-340.

Lugtenberg, B., Kamilova, F. (2009). Plant growth promoting rhizobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 63:541-556.

Park, J.H., Bolan, N., Megharaj, M., Naidu, R. (2011). Isolation of phosphate solubilizing bacteria and their potential for lead immobilization in soil. *J Hazard Mater* 185: 829-836.

Schulz, B., Boyle, C. (2006). *What are endophytes?* pp 1-10 in Schulz, B., Boyle, C. and Sieber, T.N. *Soil Microbiology* Vol. 9. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.